

THIẾT KẾ HỆ THỐNG BIỂU HIỆN ỔN ĐỊNH GEN MÃ HÓA ENDOGLUCANASE TRONG *BACILLUS SUBTILIS* 168M

Phan Thị Tuyết Minh, Nguyễn Quốc Việt, Nguyễn Kim Thoa, Lê Gia Hy, Trần Đình Mẫn

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 09.11.2015

Ngày nhận đăng: 15.4.2016

TÓM TẮT

Trong thủy phân sinh khối lignocellulose, β -D-1,4-endoglucanase là một trong những enzyme quan trọng nhất. Tuy nhiên, các chủng vi khuẩn trong tự nhiên thường có hoạt độ β -D-1,4-endoglucanase thấp, do đó việc ứng dụng công nghệ tái tổ hợp để nâng cao hiệu suất tổng hợp enzyme đích là cần thiết. Một số hệ thống biểu hiện gen β -D-1,4-endoglucanase đã được thiết kế sử dụng các dòng tế bào chủ khác nhau. Bài báo này trình bày kết quả thiết kế hệ thống biểu hiện gen β -D-1,4-endoglucanase ổn định trong tế bào *Bacillus subtilis* 168M. Ba thành phần chính được tổ hợp với nhau dựa trên phương pháp megaprimer bao gồm promoter (180bp) của gen α -amylase từ chủng chủ *B. subtilis* 168M, toàn bộ khung đọc mở của gen β -D-1,4-endoglucanase (1500 bp) từ chủng *B. amyloliquefacient* VLSH08 với đoạn terminator (81 bp) tổng hợp của gen α -amylase từ chủng *B. licheniformis* 3BT2. Toàn bộ tổ hợp này có độ dài 1800 bp được đưa vào vector pHT43 đã được cắt bỏ trước đoạn promoter và peptide tín hiệu và biến nạp vào tế bào khả biến *B. subtilis* 168M. Chủng *B. subtilis* 168M tái tổ hợp mang vector pHT43[Bspr.endo.Blter] có hoạt tính β -D-1,4-endoglucanase là 7 U/ml, cao hơn 23 lần so với hoạt tính enzyme từ chủng tự nhiên *B. amyloliquefacient* VLSH08. Việc thiết kế và biểu hiện thành công thông biểu hiện gen β -D-1,4-endoglucanase của chủng *B. amyloliquefacient* VLSH08 trong vector pHT43 mang đoạn promoter của gen α -amylase từ chủng *B. subtilis* 168M và terminator của gen α -amylase từ chủng *B. licheniformis* 3BT2 góp phần chủ động tổng hợp hiệu quả β -D-1,4-endoglucanase hoạt tính để sử dụng.

Từ khóa: *Bacillus amyloliquefaciens* VLSH 08, biểu hiện trong *Bacillus subtilis* 168M, β -D-1,4 endoglucanase tái tổ hợp, phương pháp megaprimer, vector pHT43

MỞ ĐẦU

Trong số các enzyme thủy phân cellulose, β -D-1,4-endoglucanase (EC 3.2.1.4) là enzyme quan trọng nhất vì nó khởi động cho toàn bộ quá trình thủy phân cellulose. Tuy nhiên, hoạt tính β -D-1,4-endoglucanase từ các chủng vi sinh vật trong tự nhiên thường rất thấp, do vậy để nâng cao được hoạt tính enzyme, bên cạnh các phương pháp tối ưu điều kiện nuôi cấy chủng tự nhiên thì các kỹ thuật tạo chủng tái tổ hợp cũng được ứng dụng khá rộng rãi cả trên thế giới và ở Việt Nam. Cho đến nay, một số hệ thống biểu hiện gen β -D-1,4-endoglucanase đã được thiết kế và dung nạp vào các dòng tế bào chủ khác nhau như *Escherichia coli* BL21(DE3) (Pandey *et al.*, 2014), *Bacillus subtilis* (Liu *et al.*, 2012), *Pichia pastoris* (Várnai *et al.*, 2014)... tạo ra các chủng tái tổ hợp có hoạt tính cao gấp từ vài lần đến vài chục lần so với các chủng tự nhiên.

Biểu hiện gen ở tế bào *B. subtilis* đã thể hiện được nhiều ưu điểm hơn so với các hệ thống biểu hiện khác như tốc độ sinh trưởng nhanh, protein

ngoại lai được tiết ra ngoài môi trường, tạo điều kiện thuận lợi để thu hồi và tinh sạch. Tuy nhiên, cũng như các hệ thống biểu hiện ở các loại vật chủ khác, quá trình tổng hợp protein tái tổ hợp ở tế bào *B. subtilis* chịu tác động của rất nhiều yếu tố như sự đào thải các plasmid ngoại lai, sự cảm ứng và điều hòa quá trình biểu hiện. Do vậy, việc thiết kế được hệ thống biểu hiện protein tái tổ hợp ổn định là rất cần thiết. Để thu nhận enzyme tái tổ hợp với một lượng lớn cần phải đảm bảo gen mã hóa protein được gắn trong hệ thống vector biểu hiện ổn định bao gồm promoter mạnh, đoạn gen ngoại lai và terminator. Ngoài ra sự phù hợp giữa RNA-polymerase của chủng chủ với promoter của hệ biểu hiện cũng là một trong những yếu tố quyết định hiệu suất biểu hiện protein đích ở chủng tái tổ hợp (Davis *et al.*, 2011). Trong bài báo này chúng tôi trình bày quá trình xây dựng hệ thống biểu hiện ổn định gen β -D-1,4 endoglucanase trong vector con thoi pHT43 bao gồm promoter của gen α -amylase từ chủng *B. subtilis* 168M gắn với khung đọc mở của gen β -D-1,4 endoglucanase tách dòng từ chủng *B.*

amyloliquefaciens VLSH 08 và đoạn terminator của gen α -amylase từ chủng *B. licheniformis* 3BT2.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi sinh vật, plasmid

Chủng *Bacillus licheniformis* 3BT2, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* VLSH08 từ tập hợp chủng giống của Phòng Công nghệ Vật liệu sinh học, Viện Công nghệ sinh học.

Chủng *Bacillus subtilis* 168M nhận từ Viện Vi sinh vật và sinh học phân tử, Trường Đại học tổng hợp Greifswald, CHLB Đức.

Vector pHT43 mua của hãng Mobitec (CHLB Đức) được thiết kế chuyên để biểu hiện trong tế bào *Bacillus subtilis*.

Đoạn terminator được tổng hợp dựa trên trình tự terminator của gen α -amylase từ chủng *B. licheniformis* 3BT2 (IDT, Mỹ).

Phương pháp nghiên cứu

DNA genome của vi khuẩn được tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ Kit GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo Fisher, Mỹ).

Tái tổ hợp gen bằng phương pháp megaprimer (Upender *et al.*, 1995).

Chuẩn bị tế bào *B. subtilis* 168M khả biến và biến nạp plasmid vào tế bào *B. subtilis* theo hướng dẫn của hãng Mobitec (CHLB Đức).

Hoạt độ β -D-1,4 endoglucanase được xác định bằng lượng đường khử tạo ra từ phản ứng thủy phân CMC (Ghose, 1987) Một đơn vị CMCase được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để tạo ra 1 μ mol glucose trong một phút ở nhiệt độ 60°C, pH 6,5

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong công bố trước đây của nhóm nghiên cứu, gen β -1,4-endoglucanase của chủng *B. amyloliquefaciens* VLSH 08 đã được tách dòng và xác định trình tự khung đọc mở có chiều dài 1500 bp, mã hóa cho 499 amino acid (Phan *et al.*, 2012). Với mục tiêu nâng cao hoạt tính β -1,4-endoglucanase của chủng tự nhiên, chúng tôi đã thiết kế vector biểu hiện gen β -1,4-endoglucanase dựa trên khung của vector con thoi pHT43 (Mobitec). Đây là vector có mang đoạn promoter *grac* và trình

tự tín hiệu SamyQ, vì vậy nó có khả năng biểu hiện mạnh các protein tái tổ hợp. Tuy nhiên để đảm bảo tính phù hợp giữa các yếu tố phiên mã và dịch mã của chủng chủ với promoter của hệ biểu hiện, cả hai thành phần trên đều được cắt bỏ khỏi vector gốc bằng hai enzyme giới hạn *KpnI* và *SmaI*, thay vào đó là promoter của gen α -amylase từ chủng chủ *B. subtilis* 168M và đoạn peptide tín hiệu của chính gen β -1,4-endoglucanase từ chủng *B. amyloliquefaciens* VLSH08.

Phân lập promoter của gen α -amylase từ chủng *B. subtilis* 168M

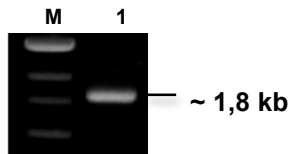
DNA genome của chủng *B. subtilis* 168M được tách chiết và dùng làm khuôn để khuếch đại đoạn promoter của gen α -amylase bằng cặp mồi P_{1BS} (5'-TTGATTTGTATTCACTCTGCC-3') và P_{KE} là đoạn mồi kép được thiết kế dựa trên trình tự trước codon khởi đầu của gen α -amylase và từ codon khởi đầu gen β -1,4 endoglucanase của chủng *B. amyloliquefaciens* VLSH08 (5'-AGAGATTGACCGTTTCATTCTTGACACTCCTTATTTGA-3'). Sản phẩm thu được có kích thước 180 bp, phù hợp với tính toán lý thuyết. Tuy nhiên để khẳng định chính xác sản phẩm khuếch đại gen là đoạn DNA mong muốn, sản phẩm PCR được tinh sạch rồi gắn vào vector TA cloning pCR2.1 (Invitrogen) và xác định trình tự bằng cặp mồi pUC/M13 sequencing. Trình tự đoạn DNA này tương đồng 99% với đoạn DNA có chứa hệ thống promoter của gen α -amylase của các chủng thuộc loài *B. subtilis* đã được công bố trên Ngân hàng gen.

Tạo tổ hợp [Bspr.endo.Blter] bao gồm promoter gen α -amylase của chủng *B. subtilis* 168M, khung đọc mở gen β -1,4-endoglucanase của chủng *B. amyloliquefaciens* VLSH08 và terminator của gen α -amylase từ chủng *B. licheniformis* 3BT2

Song song với bước khuếch đại promoter của gen α -amylase từ chủng *B. subtilis* 168M, khung đọc mở của gen β -1,4-endoglucanase của chủng *B. amyloliquefaciens* VLSH 08 cũng được khuếch đại lại bằng cặp mồi F8 (5'-ATGAAACGGTCAATCTCT-3') và R8_BamHI (5'-CAGGATCCCTAATTTGGTTCTGATCC-3'). Sau đó, hai sản phẩm khuếch đại gen tiếp tục được sử dụng làm khuôn để tổng hợp đoạn gen bao gồm cả hai thành phần bằng cặp mồi P_{1BS} và R8. Tổ hợp gen mới [Bspr.endo] được gắn vào vector TA cloning pCR2.1 (Invitrogen) và xác định trình tự bằng cặp mồi pUC/M13 sequencing để đảm bảo quá trình tái tổ hợp vẫn đảm bảo mức độ chính xác của

quá trình dịch mã từ promoter sang mã khởi đầu của gen đích.

Mặt khác, đoạn terminator của gen *α -amylase* từ chủng *B. licheniformis* 3BT2 được tổng hợp có chiều dài 81 bp, bao gồm 24 nucleotide có trình tự các nucleotide hỗ trợ cho nhau tạo thành dạng kẹp tóc là tín hiệu để kết thúc quá trình phiên mã. Đoạn terminator này có gắn thêm trình tự enzyme giới hạn *Bam*HI. Tổ hợp mới [Bspr.endo] và đoạn terminator ở trên cùng được xử lý với *Bam*HI trước khi được ghép với nhau bởi T4 ligase tạo thành hộp gen (cassette) mới [Bspr.endo.Blter]. Cặp mồi P_{1Bs} và mồi P_{3BI} (5'-CAAAGAAATTTTATAAGAA GGAG-3') được sử dụng để khuếch đại lại toàn bộ tổ hợp [Bspr.endo.Blter]. Sản phẩm khuếch đại cuối cùng có kích thước khoảng 1.800 bp được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% (Hình 1), đồng thời được gắn vào vector tách dòng pCR2.1 trước khi biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* TOP10F' bằng xung điện để nhân dòng. Các dòng plasmid mang cassette [Bspr.endo.Blter] sau đó được cắt kiểm tra bằng *Sma*I và *Kpn*I.

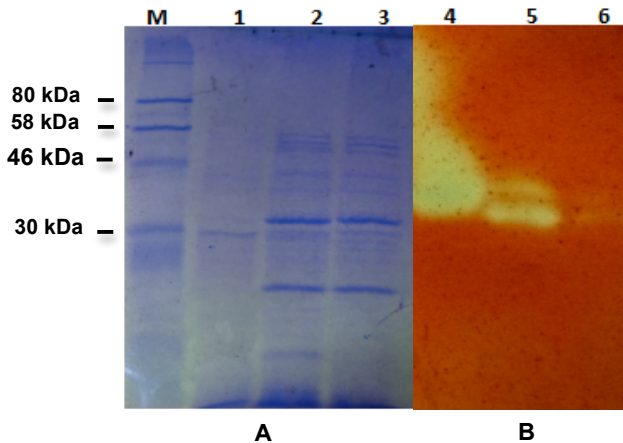


Hình 1. Khuếch đại tổ hợp [Bspr.endo.Blter] bằng cặp mồi P_{1Bs} và P_{3BI} có kích thước khoảng 1.800 bp. M: 1kb DNA marker (Fermentas); 1: Sản phẩm khuếch đại gen.

Tổ hợp [Bspr.endo.Blter] từ vector pCR2.1 được xử lý với *Sma*I và *Kpn*I và gắn vào hai vị trí tương ứng trên vector pHT43 đã loại đoạn promoter *grac* và trình tự tín hiệu SamyQ. Vector pHT43[Bspr.endo.Blter] sau đó được nhân dòng trên tế bào *E. coli* TOP10F' trước khi biến nạp vào tế bào *B. subtilis* 168M.

Biểu hiện tổ hợp [Bspr.endo.Blter] trong tế bào *B. subtilis* 168M

Quá trình biến nạp vector pHT43 vào tế bào *B. subtilis* 168M khả biến được thực hiện theo quy trình của hãng Mobitec. Các khuẩn lạc riêng rẽ sau khi tách riêng, được nuôi cấy để tách plasmid và kiểm tra lại sự có mặt của tổ hợp [Bspr.endo.Blter] bằng *Sma*I và *Kpn*I. Các khuẩn lạc mang vector pHT43[Bspr.endo.Blter] sau đó được nuôi trên môi trường LB có bổ sung chloramphenicol 5 μ g/ml và 0,8 g/l L-Tryptophan, nuôi ở 37°C trong 36h để thu nhận enzyme ngoại bào. Kết quả điện di đồ protein dịch nuôi cấy chủng *B. subtilis* 168M tái tổ hợp và zymogram trên cơ chất CMC cho thấy tại vị trí protein có kích thước 35 kDa và 42 kDa có xuất hiện vòng thủy phân CMC (Hình 2). Hai vòng thủy phân này tương ứng với hoạt tính β -D-1,4-endoglucanase của protein tái tổ hợp và enzyme của chủng chủ *B. subtilis* 168M.

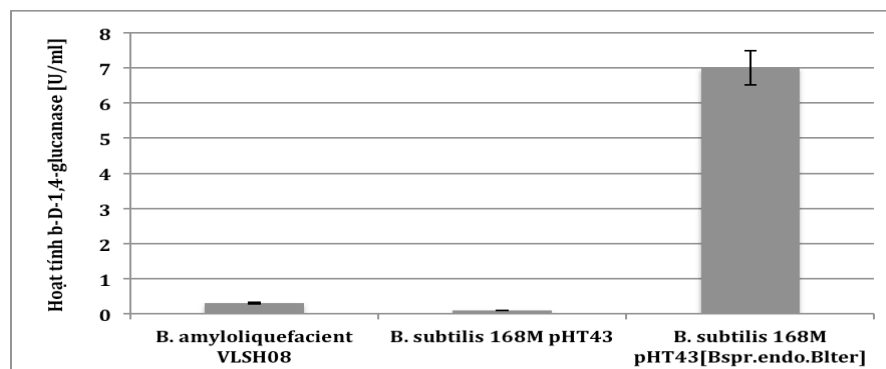


Hình 2. Điện di đồ protein và zymogram hoạt tính thủy phân 1% CMC của dịch nuôi cấy chủng *B. subtilis* 168M tái tổ hợp mang vector pHT43[Bspr.endo.Blter]. M: Marker NEB P7708S; **A.** Giếng 1: Protein tổng số từ dịch nuôi cấy chủng *B. subtilis* 168 mang vector pHT43 nguyên bản; Giếng 2 và 3: Protein tổng số của dịch nuôi cấy chủng *B. subtilis* mang vector pHT43 [Bspr.endo.Blter]. **B.** Giếng 4 và 5: Hoạt tính thủy phân 1% CMC của dịch nuôi cấy chủng *B. subtilis* mang vector pHT43 [Bspr.endo.Blter] tại vị trí 35 kDa và 42 kDa; Giếng 6: Hoạt tính thủy phân 1% CMC của dịch nuôi cấy chủng *B. subtilis* mang vector pHT43 nguyên bản.

Nghiên cứu của Zeigler (2000) cho thấy gen β -D-1,4-endoglucanase của chủng *B. subtilis* 168M có kích thước 1.527 nucleotide, mã hóa cho 508 amino acid. Đoạn peptide tín hiệu của các protein từ loài thuộc chi *Bacillus* có độ dài từ 28-31 amino acid (Zeigler, 2000). Do đó, theo tính toán lý thuyết, β -D-1,4-endoglucanase từ chủng chủ *B. subtilis* 168M và enzyme tái tổ hợp phải có kích thước tương ứng là 52 kDa và 50 kDa. Tuy nhiên, trên zymogram lại thấy xuất hiện vòng thủy phân ứng với vị trí 42 kDa và 35 kDa. Điều này có ý nghĩa protein khi tiết ra ngoài môi trường đã bị cắt ngắn lại 10-15 kDa. Beta-D-1,4-endoglucanase tiết ra ngoài môi trường tồn tại ở dạng bị “cắt xén”. Hiện tượng này cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Lo *et al.* (1988) khi biểu hiện β -D-1,4-endoglucanase của chủng *B. subtilis* PAP115 trong tế bào *E. coli* JM103. Phân tích kích thước protein từ dịch nuôi cấy và dịch phá tế bào của chủng *E. coli* JM103 tái tổ hợp và chủng *B. subtilis* PAP115 cho thấy các enzyme β -D-1,4-endoglucanase đều có kích thước 35,8 kDa nhỏ hơn so với tính toán lý thuyết 16,4 kDa. Nhóm nghiên

cứ đã tạo đột biến gen, cắt một đoạn gen mã hoá cho 163 amino acid về phía đầu C của β -D-1,4-endoglucanase mà vẫn thu được protein mang đầy đủ đặc điểm thủy phân CMC của chủng tự nhiên. Điều này có thể được giải thích như sau: toàn bộ tâm gắn cơ chất và tâm xúc tác của β -D-1,4-endoglucanase đều nằm ở các vị trí gần đầu N của enzyme, do đó có thể trong quá trình đóng gói protein, tế bào đã tự cắt làm giảm kích thước protein, làm cho protein trở nên “nhỏ gọn” tạo điều kiện thuận lợi cho việc tiết protein ra dịch nuôi cấy (Lo *et al.*, 1998). Tuy nhiên, với sự phát triển của các thiết bị nghiên cứu hiện nay, để khẳng định giả thuyết trên cần thiết phải tiến hành xác định trình tự protein của các enzyme tái tổ hợp sau khi tinh sạch.

Hoạt tính β -D-1,4-endoglucanase của chủng *B. subtilis* 168M tái tổ hợp mang vector pHT43[Bspr.endo.Blter] được xác định cho thấy chủng có hoạt độ ổn định $7 \pm 0,5$ U/ml, cao hơn hoạt tính của chủng tự nhiên *B. amyloliquefaciens* VLSH08 (0,3 U/ml) 23 lần (Hình 3).



Hình 3. Hoạt tính β -D-1,4-endoglucanase của chủng tự nhiên *B. amyloliquefacient* VLSH08 và chủng *B. subtilis* 168M tái tổ hợp mang vector pHT43[Bspr.endo.Blter].

Công nghệ tái tổ hợp hiện nay đã cho phép nâng cao khả năng tổng hợp các protein/enzyme mong muốn lên đến hàng chục, thậm chí hàng trăm lần. Pandey *et al.* (2014) đã tách dòng gen β -D-1,4-endoglucanase của chủng *B. subtilis* IARI-SP-1 từ đất được tưới bằng nước thải của nhà máy bột giấy trong một thời gian dài và biểu hiện nó trong *E. coli* BL21(DE3). Chủng tái tổ hợp có hoạt tính β -D-1,4-endoglucanase cao gấp 4 lần so với chủng tự nhiên, đạt 10 IU/ml (Pandey *et al.*, 2014). Trong nghiên cứu này, hoạt tính β -D-1,4-endoglucanase của chủng *B. subtilis* 168M tái tổ hợp mang vector pHT43[Bspr.endo.Blter] đã tăng gấp 23 lần so với chủng đại, hoạt tính này vẫn có thể tiếp tục được

nâng cao hoạt tính lên nữa bằng cách tối ưu các điều kiện biểu hiện.

KẾT LUẬN

Đã thiết kế thành công thống biểu hiện gen β -D-1,4-endoglucanase của chủng *B. amyloliquefacient* VLSH08 trong vector pHT43 mang đoạn promoter của gen α -amylase từ chủng *B. subtilis* 168M và terminator của gen α -amylase từ chủng *B. licheniformis* 3BT2 có tổng chiều dài 1.800 bp. Enzyme tái tổ hợp có hoạt tính 7 U/ml, cao hơn 23 lần so với hoạt tính của chủng tự nhiên.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện tại Phòng Công nghệ vật liệu sinh học, Viện Công nghệ sinh học nhờ nguồn kinh phí của Đề tài “Nghiên cứu tạo chế phẩm enzyme tái tổ hợp thủy phân lignocellulose phục vụ sản xuất cồn nhiên liệu”, mã số KC.04.22/06-10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Davis JH, Rubin AJ, Sauer RT (2011) Design, construction and characterization of a set of insulated bacterial promoters. *Nucleic Acids Res* 39(3): 1131-1141.

Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* 2(59): 257-268.

Liu JM, Xin XJ, Xu JH, Bao J (2012) Cloning of thermostable cellulase genes of *Clostridium thermocellum* and their secretive expression in *Bacillus subtilis*. *Appl Biochem Biotechnol* 166(3): 652-662.

Lo AC, MacKay RM, Seligy VL, Willick GE (1998) *Bacillus subtilis* β -1,4-endoglucanase products from intact and truncated genes are secreted into the extracellular medium by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*

54(9): 2287-2292.

Pandey S, Kushwah J, Tiwari R, Kumar R, Somvanshi VS, Nain L, Saxena AK (2014) Cloning and expression of β -D-1,4-endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* isolated from soil long term irrigated with effluents of paper and pulp mill. *Microbiol Res* 169(9-10): 693-698.

Phan MTT, Nguyen VQ, Le HG, Nguyen TK, Tran MD (2012) Molecular cloning gene and nucleotide sequence of the gene encoding an endo-1,4-beta-glucanase from *Bacillus* sp VLSH08 strain applying to biomass hydrolysis. *J Viet Env* 3(2): 80-86.

Upender M, Raj L, Weir M (1995) Megaprimer method for in vitro mutagenesis using parallel templates. *Biotechniques* 18(1): 29-30.

Várnai A, Tang C, Bengtsson O, Atterton A, Mathiesen G, Eijsink VG (2014) Expression of endoglucanase in *Pichia pastoris* under control of the GAP promoter. *Microb Cell Fact* 13: 57-66.

Zeigler DR (2000) *Bacillus* Genetic Stock Center Catalog of Strains, Seventh Edition, Vol 1: *Bacillus subtilis* 168. <http://www.bgsc.org/catalogs/Catpart1.pdf>.

CONSTRUCTION OF A STABLE EXPRESSION SYSTEM FOR ENDOGLUCANASE IN *BACILLUS SUBTILIS* 168M

Phan Thi Tuyet Minh, Nguyen Quoc Viet, Nguyen Kim Thoa, Le Gia Hy, Tran Dinh Man[✉]

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Beta-D-1,4-endoglucanase plays an important role in biomass hydrolysis, the microorganisms in nature can synthesize this enzyme at very low activity. Together with development of biotechnology, a low enzymatic activity problem has been overcome by using the recombinant method. Several expression systems for β -D-1,4-endoglucanase were designed for use of different cell lines. In this paper, we have constructed a stable expression system for β -D-1,4-endoglucanase gene in *Bacillus subtilis* 168M. Three main components including the promoter (180 bp) of α -amylase gene from the host strain *B. subtilis* 168M, the whole open reading frame of β -D-1,4-endoglucanase (1,500 bp) gene from *B. amyloliquefacient* VLSH08 strain, and the terminator (81 bp) of α -amylase gene from *B. licheniformis* 3BT2 strain, were reconstructed via megaprimer method. Subsequently, this new reconstitution was ligated into a modified pHT43 vector which was cleaved its own promoter and signal peptide fragment (AmyQ) and transformed into the competent *B. subtilis* 168M. The recombinant *B. subtilis* 168M carrying pHT43[Bspr.endo.BIter] vector showed β -D-1,4-endoglucanase activity at 7 U/ml, 23 times higher than that of the wild type *B. amyloliquefacient* VLSH08 strain. The successful design and expression of the expression system β -D-1,4-endoglucanase isolated from *B. amyloliquefacient* strain VLSH08 in pHT43 vector carrying the promoter of the α -amylase gene from *B. subtilis* strain 168M and the terminator of the α -amylase gene from *B. licheniformis* strain 3BT2, actively contribute effectively expression of β -D-1,4-endoglucanase for use.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens* VLSH 08, expression in *Bacillus subtilis* 168M, recombinant β -D-1,4 endoglucanase, megaprimer method, pHT43 vector

✉ Author for correspondence: Tel: +84-4-37567103; E-mail: tdman@ibt.ac.vn